

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-41999

(43)公開日 平成5年(1993)2月23日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/26	6807-4B		
	1/30	6807-4B		
	1/32	6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数7(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-259544

(22)出願日 平成3年(1991)8月9日

(71)出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(71)出願人 591086706

軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地16

(72)発明者 関根 吉家

東京都東村山市野口町1-1-7コーポチエリ-303号

(72)発明者 軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

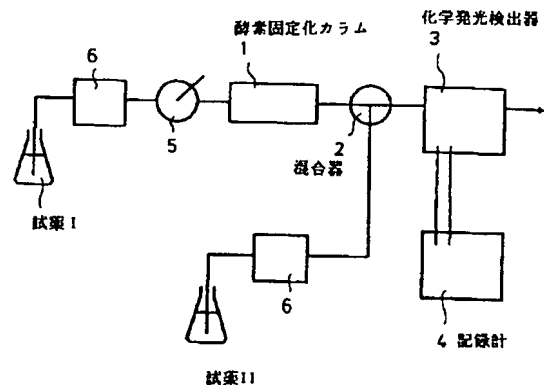
(74)代理人 弁理士 舟橋 榮子

(54)【発明の名称】 メタノールの定量法

(57)【要約】

【構成】 本発明は、メタノールを順次、アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ及びホルムアルデヒド脱水酵素により蟻酸まで酸化し、そのとき生成する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドを測定することを特徴とするメタノールの選択的定量法である。

【効果】 酵素を用いてメタノールの定量を選択的に行うことができ、測定時間が短くその感度や精度を向上させたメタノール定量法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 メタノールを順次、アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ及びホルムアルデヒド脱水酵素により蟻酸まで酸化し、そのとき生成する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドを測定することを特徴とするメタノールの選択的定量法。

【請求項2】 酵素反応により生成した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドの測定を、還元性色素を用いて酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1記載の定量法。

【請求項3】 還元性色素が1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートであり、これを用いて酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1または2記載の定量法。

【請求項4】 酵素反応により生成した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドの測定を、還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼにより酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1記載の定量法。

【請求項5】 最終生成物の過酸化水素の定量をルミノールを用いた化学発光測定法により行う請求項2、3または4記載の定量法。

【請求項6】 アルコールオキシダーゼ、ホルムアルデヒド脱水酵素を固定化した反応カラムを用いてフローインジェクション分析法により定量する請求項4または5記載の定量法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酵素を用いてメタノールの測定を選択的に行うことを特徴とするメタノール選

## 【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】メタノール測定法としては、①ガスクロマトグラフ法、②メタノール資化細菌を用いた微生物センサー、③日本薬局方に収載されている比色法のメタノール試験法などがある。しかし、①は測定精度に関して信頼できるが、測定試料中の爽雜物がカラムから溶出しきらないと次の試料が分析できないので、測定時間がかかり、高圧ガスを必要とするため安全面からも問題点があった。また、②は測定時間がかかるほかに、測定できる範囲が5～20ppmと小さく、③は測定感度、測定精度等に問題点があった。

【0003】本発明は、これらの問題点を解決し、測定時間が短く、その感度や精度を向上させたメタノール定量法を提供することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明のメタノール定量法は、メタノールを順次、アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ及びホルムアルデヒド脱水酵素により蟻酸まで酸化し、そのとき生成する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドを測定することを特徴とする。さらに、酵素反応時に発生する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドを還元性色素である1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート、あるいは還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼを用いて過酸化水素を発生させ、ルミノールとの化学発光により高感度に定量する。

【0005】本発明による一連の反応式を図式化すると化1の通りである。

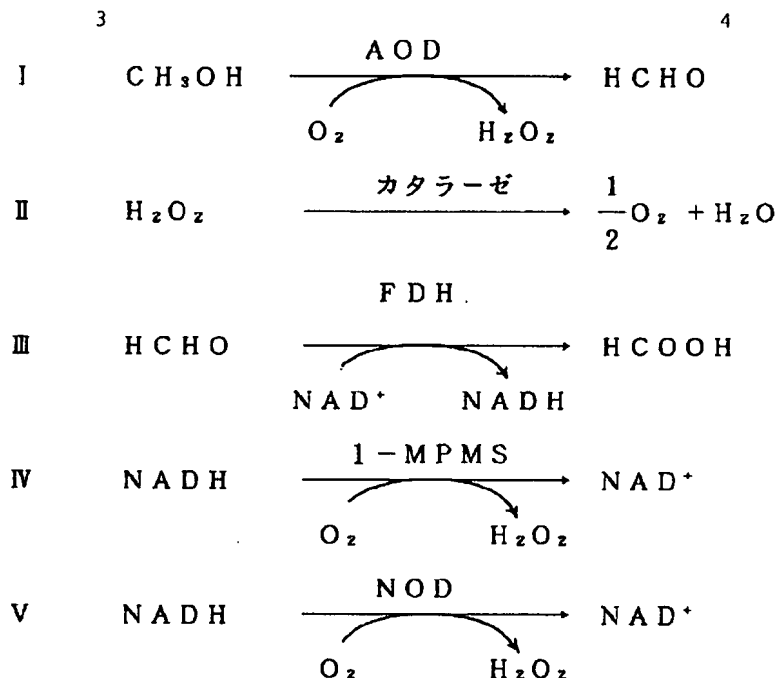
## 【0006】

## 【化1】

10

20

30



【0007】AOD：アルコールオキシダーゼ、FDH：ホルムアルデヒド脱水素酵素、 $\text{NAD}^+$ ：酸化型ニコチンアデニンジヌクレオチド、 $\text{NADH}$ ：還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド、1-MPMS：1-メトキシ-5-メチルフェナチニウムメチルサルフェート、NOD： $\text{NADH}$ オキシダーゼ。

【0008】すなわち、I、III 式の反応のように、アルコールオキシダーゼとホルムアルデヒド脱水素酵素の連続した酵素反応によりメタノールを蟻酸に酸化すると、メタノール量に比例した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドが生成する。同時に生成する過酸化水素は、電極反応、化学発光、比色法により、測定可能であるが、これを測定しても、メタノールに対して選択性の低い信号しか得られないので、カタラーゼを作用させ測定系中より消去する。次に、III 式で生成した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドをIV、あるいはV式の反応により過酸化水素を生成させ、この過酸化水素を電極反応、化学発光、比色法を用いて測定することを研究した結果、メタノールに対して選択性の高い信号を得ることが可能であると判った。これら一連の反応は溶液状態でも測定可能であるが、望ましくは測定操作を簡単にするために、このとき用いる酵素試薬は固定化操作を行い、酵素固定化カラムを用いて連続反応を行うフローインジェクション分析法システムとして測定する方がよい。しかし、この操作に関しては何ら限定せしめるものではない。

【0009】

【実施例】次に実施例を用い、本発明を具体的に説明する。

実施例 1

アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素の固定カラムと1-メトキシ-5-メチルフェナチニウムメチルサルフェートを用いた場合の実施例を以下に示す。

(1) 試薬の調整

a) 試薬 I

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを37.2mg、1-メトキシ-5-メチルフェナチニウムメチルサルフェートを2mg、酸化型ニコチンアデニンジヌクレオチドを28.7mg量り取り、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて200mlに定容した。

【0010】b) 試薬 II

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを37.2mg、ルミノールを0.2mg、ペルオキシダーゼを0.2mg量り取り、0.2Mホウ酸緩衝液(pH9.5)を用いて200mlに定容した。

c) 試薬 III

アミノプロピル処理した多孔質のガラスビーズ(粒径200~400μmメッシュ、孔径約500オングストローム)100mgと2.5%グルタルアルデヒド溶液を、緩やかに攪拌しながら室温で1時間反応させた。水洗後、グルタルアルデヒド処理後のガラスビーズと10Uのアルコールオキシダーゼとを混合し、4℃で20時間反応させてアルコールオキシダーゼの固定化酵素を得た。

【0011】d) 試薬 IV

試薬 III と同様の操作を行い、5mgのカタラーゼを用いてカタラーゼの固定化酵素を得た。

e) 試薬 V

試薬 III と同様の操作を行い、5mgのホルムアルデヒド脱水素酵素を用いてホルムアルデヒド脱水素酵素の固定化酵素を得た。

## 【0012】f) 試薬VI

試薬III、IV、Vを30mm×2mm i.d.のカラムに、カラムの上流から1cmずつ詰め、酵素固定化カラムを得た。

## (3)測定操作

試薬I、II、VIを用いて図1に示すような測定システムを組み測定を行った。試薬Iを酵素固定化カラム1の試薬VIに注入し、これを混合機2を用いて試薬IIと混合し、化学発光検出器3で測定し記録計4で読み取った。化学発光の検出は、極大波長が約450nmで行い、検出器は825-CL(日本分光株式会社製)を用いた。この測定システムにより求めたメタノールに対する検量線を図2に示した。縦軸は相対発光強度、横軸は濃度である。

【0013】このとき、この検量線は以下のように作成した。すなわち、メタノールを用い0.1～100ppm濃度に50mMリン酸緩衝液を用いて調製した溶液を20μlインジェクターにより注入し、記録計に出力された信号の高さをそれぞれの濃度に対してプロットすることにより作成した。このとき、記録計に出力されるシグナルは図3のようになり、この図中、Aの高さを計測することにより検量線を作成した。この結果、図2よりメタノールは0.1～100ppmまで測定可能であることが判り、10ppmのメタノールを10回繰り返し測定した際の変動係数は4.98%と良好な結果が得られた。

## 【0014】実施例2

アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼの固定化カラムを用いた場合の実施例を以下に示す。

## (1)試薬の調整

## a) 試薬VII

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを37.2mg、酸化型ニコチンアデニンジヌクレオチドを28.7mg量り採り、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて200mlに定容した。

## b) 試薬II

実施例1の試薬IIと同様に調製した。

## 【0015】c) 試薬III

実施例1の試薬IIIと同様に調製した。

## d) 実施例IV

実施例1の試薬IVと同様に調製した。

## e) 試薬V

実施例1の試薬Vと同様に調製した。

## 【0016】f) 試薬VIII

\* 試薬IIIと同様の操作を行い、5mgの還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼを用いて還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼの固定化酵素を得た。

## 【0017】g) 試薬IX

試薬III、IV、V、VIIIを40×mm×2mm i.d.のカラムに、カラムの上流から順次1cmずつ詰め、酵素固定化カラムを得た。

## (2)測定操作

10 試薬II、VII、IXを用いて図4に示すような測定システムを組み、測定を行った。この測定システムにより求めたメタノールに対する検量線を図5に示した。このときの検量線は実施例1と同様に作成した。すなわち、メタノールの純品を用い、0.1～100ppm濃度に50mMリン酸インジェクターより注入し、記録計に出力された信号の高さをそれぞれの濃度に対してプロットすることにより作成した。図5よりメタノールは0.1～100ppmまで測定可能であることが判り、10ppmのメタノールを10回繰り返し測定した際の変動係数は4.94%であり、実施例1とほぼ同様の結果を得た。

## 【0018】実施例3

液状試料として市販の白ワイン、ロゼワイン、赤ワインおよび米酢について、実施例1の測定システムを用いて測定した。測定試料の調製は、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で20倍に希釈し、これを20μlインジェクターより注入することにより測定を行った。このとき、実施例1で作成したメタノールに対する検量線を用い、これにより試料中のメタノール濃度を計算した。本実施例では、実施例1の測定システムを用いたが、実施例2の測定システムを用いても、同様の結果が得られた。次表に、本発明による測定法とガスクロマトグラフ法を比較した結果を示した。従来法としてガスクロマトグラフ法を用いたが、この時のガスクロマトグラフィー条件は、装置本体にHP5890A(ヒューレットパッカード社製)を、カラムにはDB-WAX(J&W社製:30m×0.53mm i.d.)を用い、カラム温度は初期温度40℃で3分間保持した後、最終温度120℃まで5℃/分で昇温をかけ測定を行った。表から明らかなように、ほぼ同様の結果が得られた。しかも、本実施例では測定時間が2分

40 と、従来の1/20の短い時間で測定可能であった。

## 【0019】

\* 【表1】

	白ワイン	ロゼワイン	赤ワイン	米酢
ガスクロ法 (ppm)	34.8	48.9	113	10
本発明法 (ppm)	36.5	54.4	106	16

ルの定量を選択的に行うことができ、測定時間が短くその感度や精度を向上させたメタノール定量法を提供する。しかも、従来法に比較して高圧ガス等を必要とせず安全に操作を行うことができる。また、測定範囲が0.1～100ppmと幅広く、種々の試料を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1による測定システムの概略図。

【図2】実施例1におけるメタノールに対する検量線を示したグラフ。縦軸は相対発光強度、横軸は濃度である。

【図3】実施例1における記録計に出力されるシグナル\*

\*を示す図。

【図4】実施例2による測定システムの概略図。

【図5】実施例2におけるメタノールに対する検量線を示したグラフ。縦軸は相対発光強度、横軸は濃度である。

【符号の説明】

1：酵素固定化カラム

2：混合機

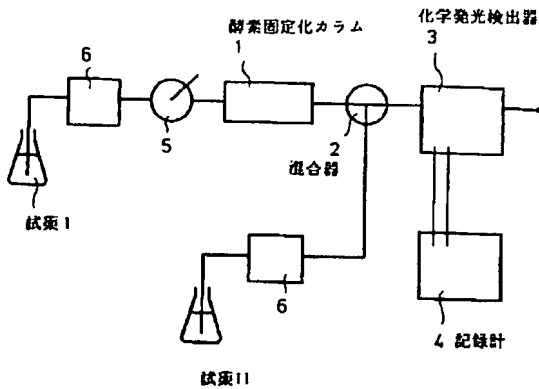
3：化学発光検出器

4：記録計

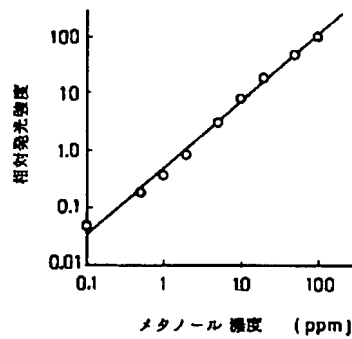
5：インジェクター

6：ポンプ

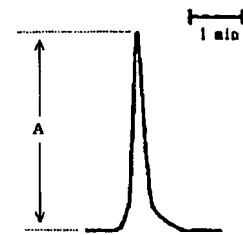
【図1】



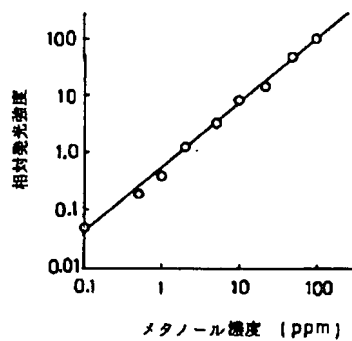
【図2】



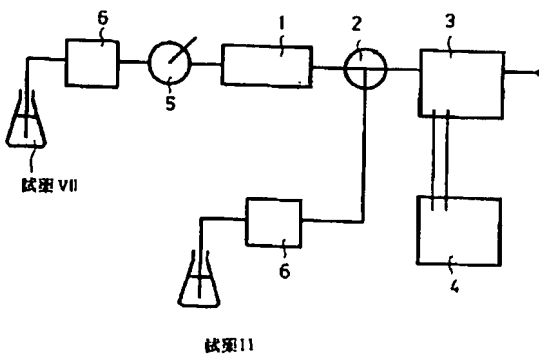
【図3】



【図5】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成3年10月18日

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】メタノールの定量法

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 メタノールを順次、アルコールオキシダーゼ、カタラーゼ及びホルムアルデヒド脱水素酵素により蟻酸まで酸化し、そのとき生成する還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドを測定することを特徴とするメタノールの選択的定量法。

【請求項2】 酵素反応により生成した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドの測定を、還元性色素を用いて酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1記載の定量法。

【請求項3】 還元性色素が1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートであり、これを用いて酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1または2記載の定量法。

【請求項4】 酵素反応により生成した還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドの測定を、還元型ニコチンアデ

ニンジヌクレオチドオキシダーゼにより酸化し、このとき生成する過酸化水素を定量することにより行う請求項1記載の定量法。

【請求項5】 最終生成物の過酸化水素の量をルミノールを用いた化学発光測定法により行う請求項2、3または4記載の定量法。

【請求項6】 アルコールオキシダーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素を固定化した反応カラムを用いてフローインジェクション分析法により定量する請求項2、3または5記載の定量法。

【請求項7】 アルコールオキシダーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型ニコチンアデニンジヌクレオチドオキシダーゼを固定化した反応カラムを用いてフローインジェクション分析法により定量する請求項4または5記載の定量法。

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-041999

(43)Date of publication of application : 23.02.1993

(51)Int.Cl. C12Q 1/26

C12Q 1/30

C12Q 1/32

(21)Application number : 03-259544

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD  
CO LTD

KARUBE MASAO

(22)Date of filing : 09.08.1991

(72)Inventor : SEKINE YOSHII  
KARUBE MASAO

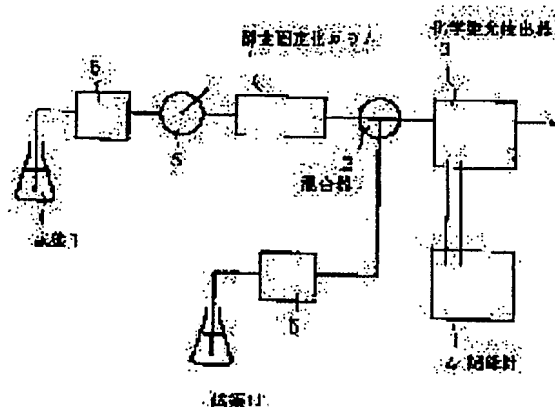
## (54) METHOD FOR DETERMINING METHANOL

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To improve sensitivity and accuracy and determine methanol in a short time by successively oxidizing the methanol into formic acid with an alcohol oxidase, a catalase and a formaldehyde dehydrogenase and measuring the produced NADH.

**CONSTITUTION:** Methanol in a liquid sample such as wine or rice vinegar is measured. In the process, the sample is mixed with a reagent containing a reducing coloring matter and an oxidized form nicotinamide adenine dinucleotide, etc., then fed to an enzyme-immobilized column 1 with a pump 6 and an injector 5, and the methanol is successively oxidized into formic acid with an immobilized alcohol oxidase, catalase and formaldehyde dehydrogenase. The produced reduced form nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is oxidized with a reducing coloring

matter to mix and react the formed hydrogen peroxide with a reagent II containing luminol and a peroxidase, etc., in a mixer 2. The generated chemiluminescent quantity is sensed and measured with a chemiluminescent sensor 3 to determine the methanol in



the sample.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]



**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

**[Claim 1]** Alternative assay of the methanol characterized by measuring the reduction type nicotine adenine dinucleotide which even formic acid oxidizes with alcohol oxidase, a catalase, and formaldehyde dehydratase, and generates a methanol then one by one.

**[Claim 2]** Assay according to claim 1 performed by carrying out the quantum of the hydrogen peroxide which oxidizes using reducibility coloring matter and generates measurement of the reduction type nicotine adenine dinucleotide generated by the enzyme reaction at this time.

**[Claim 3]** Assay according to claim 1 or 2 performed by carrying out the quantum of the hydrogen peroxide which reducibility coloring matter is 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate, oxidizes using this, and is generated at this time.

**[Claim 4]** Assay according to claim 1 performed by carrying out the quantum of the hydrogen peroxide which oxidizes by the reduction type nicotine adenine dinucleotide oxidase, and generates measurement of the reduction type nicotine adenine dinucleotide generated by the enzyme reaction at this time.

**[Claim 5]** Assay according to claim 2, 3, or 4 which performs the quantum of the hydrogen peroxide of an end product with the chemiluminescence measuring method using luminol.

**[Claim 6]** Assay according to claim 4 or 5 which carries out a quantum with a flow injection analysis method using the reaction column which fixed alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase.

---

**[Translation done.]**

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the methanol alternative assay characterized by measuring a methanol alternatively using an enzyme.

[0002]

[Description of the Prior Art] There is a methanol test of the colorimetric method by which adoption is carried out to the microbial sensor using \*\* gas chromatography and \*\* methanol utilization bacteria as a methanol measuring method and \*\* Japanese pharmacopoeia etc. However, since the following sample could not be analyzed unless \*\*\*\*\* in a test portion had been eluted from the column, the measuring time started, and although \*\* was reliable about the accuracy of measurement, since high pressure gas was needed, there was a trouble also from a safety aspect. Moreover, for \*\*, the range which the measuring time starts and also can be measured is 5-20 ppm. It was small and \*\* had a trouble in sensitometry, the accuracy of measurement, etc.

[0003] This invention solves these troubles, and the measuring time is short and it aims at offering the methanol assay which raised the sensibility and precision.

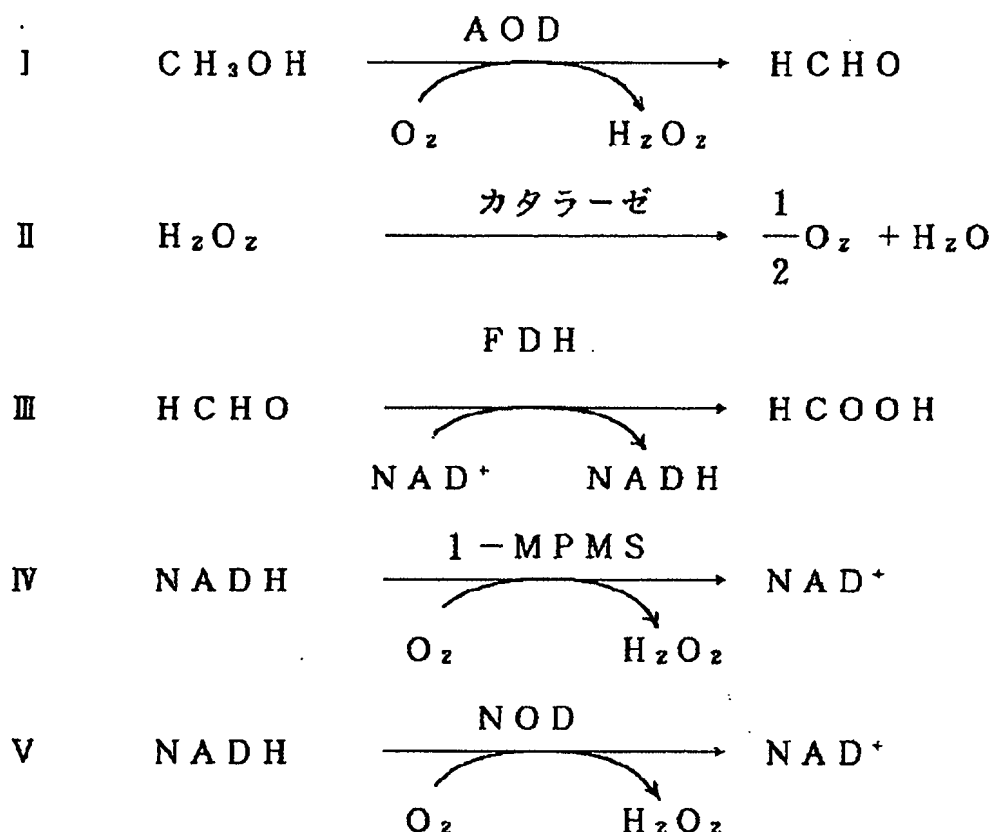
[0004]

[Means for Solving the Problem] Methanol assay of this invention is characterized by measuring the reduction type nicotine adenine dinucleotide which even formic acid oxidizes with alcohol oxidase, a catalase, and formaldehyde dehydratase, and generates a methanol then one by one. Furthermore, a hydrogen peroxide is generated using the 1-methoxy-5-methyl FENACHINIUMU methyl sulfate which is reducibility coloring matter about the reduction type nicotine adenine dinucleotide generated at the time of an enzyme reaction, or a reduction type nicotine adenine dinucleotide oxidase, and a quantum is carried out to high sensitivity by chemiluminescence with luminol.

[0005] When a series of reaction formulae by this invention are diagramed, it is as \*\* 1.

[0006]

[Formula 1]



[0007] AOD: Alcohol oxidase, FDH:formaldehyde dehydrogenase, NAD<sup>+</sup> : Oxidization mold nicotine adenine dinucleotide, NADH:reduction-type nicotine adenine dinucleotide, 1-MPMS:1-methoxy-5-methyl FENACHINIUMU methyl sulfate, NOD: NADH oxidase.

[0008] Namely, I and III If a methanol is oxidized to formic acid like the reaction of a formula by the enzyme reaction by which formaldehyde dehydrogenase followed alcohol oxidase, the reduction type nicotine adenine dinucleotide proportional to the amount of methanols will generate. Since only the low signal of selectivity is acquired to a methanol by electrode reaction, chemiluminescence, and the colorimetric method even if it measures this although it is measurable, the hydrogen peroxide generated to coincidence makes a catalase act, and is eliminated from the inside of system of measurement. Next, III The reaction of IV or V type was made to generate a hydrogen peroxide for the reduction type nicotine adenine dinucleotide generated by the formula, and as a result of studying measuring this hydrogen peroxide using electrode reaction, chemiluminescence, and a colorimetric method, it turned out that it is possible to acquire the high signal of selectivity to a methanol. It is better to measure as a flow injection analysis method system which the enzyme reagent used at this time performs fixed actuation, and performs a successive reaction using an enzyme fixed column, in order to simplify measurement actuation desirably although the reaction of these single strings is measurable also in the state of a solution. However, you do not make it limit at all about this actuation.

[0009]

[Example] Next, this invention is concretely explained using an example.

The example at the time of using example 1 alcohol oxidase, a catalase, and the fixed column of formaldehyde dehydrogenase and 1-methoxy-5-methyl FENACHINIUMU methyl sulfate is shown below.

(1) They are 37.2mg and 1-methoxy-5-methyl phenazinium about the adjustment a

reagent I disodium ethylenediaminetetraacetate of a reagent. 2mg and 28.7mg of oxidization mold nicotine adenine dinucleotide are measured, methyl sulfate is taken, and it is 50mM phosphate buffer solution (pH7.0). It uses and is 200ml. The volume was set. [0010] b) It is [ disodium ethylenediaminetetraacetate / reagent II ] 0.2mg about 0.2mg and a peroxidase in 37.2mg and luminol. It measures and takes and is the 0.2M boric-acid buffer solution (pH9.5). It uses and is 200ml. The volume was set.

c) Glass bead (particle-size 200 -400m mesh, aperture about 500 angstrom) 100mg of the reagent-III-aminopropyl-ization-processed porosity The 2.5 % glutaraldehyde solution was made to react at a room temperature for 1 hour, stirring gently. Mixed the glass bead after rinsing and glutaraldehyde processing, and the alcohol oxidase of 10U, it was made to react at 4 degrees C for 20 hours, and the immobilized enzyme of alcohol oxidase was obtained.

[0011] d) Reagent IV reagent III Same actuation was performed and the immobilized enzyme of a catalase was obtained using the 5mg catalase.

e) Reagent V reagent III Same actuation was performed and the immobilized enzyme of formaldehyde dehydrogenase was obtained using 5mg formaldehyde dehydrogenase.

[0012] f) They are the reagent VI reagent III, IV, and V 30mmx2mm i.d. The column was stuffed every 1cm from the upstream of a column, and the enzyme fixed column was obtained.

(3) It measured by constructing a gaging system as shown in drawing 1 using the measurement actuation reagents I, II, and VI. Reagent I was poured into the reagent VI of the enzyme fixed column 1, this was mixed with Reagent II using the mixer 2, and it measured with the chemiluminescence detector 3, and read with the recorder 4. For detection of chemiluminescence, maximum wave length is about 450nm. Carrying out, a detector is 825-CL (Jasco Corp. make). It used. The calibration curve over the methanol for which it asked with this gaging system was shown in drawing 2 . An axis of ordinate is relative luminescence reinforcement, and an axis of abscissa is concentration.

[0013] At this time, this calibration curve was created as follows. That is, it is 20microl about the solution which used and prepared 50mM phosphate buffer solution to 0.1-100 ppm concentration using the methanol. It poured in with the injector and created by plotting the height of the signal outputted to the recorder to each concentration. At this time, the signal outputted to a recorder became like drawing 3 , and created the calibration curve by measuring the height of A among this drawing. Consequently, as for a methanol, drawing 2 shows that it is measurable to 0.1-100 ppm, and it is 10 ppm. The result with a as good coefficient of variation at the time of repeating a methanol 10 times and measuring it as 4.98% was obtained.

[0014] The example at the time of using example 2 alcohol oxidase, a catalase, formaldehyde dehydrogenase, and the fixed column of a reduction type nicotine adenine dinucleotide oxidase is shown below.

(1) Measure 37.2mg and 28.7mg of oxidization mold nicotine adenine dinucleotide, take the adjustment a reagent VII disodium ethylenediaminetetraacetate of a reagent, and it is 50mM phosphate buffer solution (pH7.0). It uses and is 200ml. The volume was set.

b) It prepared like the reagent II of the reagent II example 1.

[0015] c) Reagent III of the reagent III example 1 It prepared similarly.

d) It prepared like the reagent IV of the example IV example 1.

e) It prepared like the reagent V of the reagent V example 1.

[0016] f) Reagent VIII reagent III Same actuation was performed and the immobilized enzyme of a reduction type nicotine adenine dinucleotide oxidase was obtained using the 5mg reduction type nicotine adenine dinucleotide oxidase.

[0017] g) They are the reagent IX reagent III, IV, V, and VIII 40xmmx2mm i.d. The column was stuffed every 1cm one by one from the upstream of a column, and the enzyme fixed column was obtained.

(2) It measured by constructing the measurement actuation reagents II and VII and a gaging system as shown in drawing 4 using IX. The calibration curve over the methanol for which it asked with this gaging system was shown in drawing 5 . The calibration curve at this time was created like the example 1. That is, using the pure article of a methanol, it poured into 0.1 – 100ppn concentration from 50mM phosphoric-acid injector, and created by plotting the height of the signal outputted to the recorder to each concentration. As for a methanol, drawing 5 shows that it is measurable to 0.1–100 ppm, and it is 10 ppm. The coefficient of variation at the time of repeating a methanol 10 times and measuring it is 4.94%, and obtained the almost same result as an example 1.

[0018] It measured using the gaging system of an example 1 about white wine, pink wine, commercial red wine, and commercial rice vinegar as an example 3 liquefied sample.

Preparation of a test portion is 50mM phosphoric acid buffer solution (pH7.0). It dilutes 20 times and is 20microl about this. It measured by pouring in from an injector. At this time, this calculated the methanol concentration in a sample using the calibration curve over the methanol created in the example 1. In this example, although the gaging system of an example 1 was used, even if it used the gaging system of an example 2, the same result was obtained. The result of having compared the measuring method and gas chromatography by this invention was shown in degree table. Although gas chromatography was used as a conventional method, the gas-chromatography conditions at this time are HP5890A (product made from Hewlett Packard) in a column to the body of equipment DB-WAX (the product made from J&W: 30m x 0.53mm i.d.) It used, and after holding column temperature for 3 minutes at the initial temperature of 40 degrees C, it measured by applying a temperature up by part for 5-degree-C/to terminal temperature 120 \*\*. . The almost same result was obtained so that clearly from a table. And in this example, the measuring time was measurable at 2 minutes and the short time amount of 1/conventional 20.

[0019]

[Table 1]

	白ワイン	ロゼワイン	赤ワイン	米酢
ガスクロ法 (ppm)	34.8	48.9	113	10
本発明法 (ppm)	36.5	54.4	106	16

[0020]

[Effect of the Invention] According to this invention, the quantum of a methanol can be alternatively performed using an enzyme and the methanol assay which raised the sensibility and precision short as for the measuring time is offered. And high pressure gas

etc. is not needed as compared with a conventional method, but it can be operated safely. Moreover, measuring range It is as broad as 0.1–100 ppm, and various samples can be measured.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The schematic diagram of the gaging system by the example 1.

[Drawing 2] The graph which showed the calibration curve over the methanol in an example 1. An axis of ordinate is relative luminescence reinforcement, and an axis of abscissa is concentration.

[Drawing 3] Drawing showing the signal outputted to the recorder in an example 1.

[Drawing 4] The schematic diagram of the gaging system by the example 2.

[Drawing 5] The graph which showed the calibration curve over the methanol in an example 2. An axis of ordinate is relative luminescence reinforcement, and an axis of abscissa is concentration.

[Description of Notations]

- 1: Enzyme fixed column
- 2: Mixer
- 3: Chemiluminescence detector
- 4: Recorder
- 5: In SHIEKUTA
- 6: Pump

---

[Translation done.]